



MAILED 06 JAN 2004
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété Industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

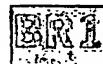
SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

Best Available Copy

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

N° 11354*03

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 17 / 210502

REPRISE DES PIÈCES DATE 18 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0213022 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 18 OCT. 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) CP/AC 60.806-1653		<input checked="" type="checkbox"/> Réserve à l'INPI
<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE <input checked="" type="checkbox"/> Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS		
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmation d'un dépôt par télécopie <input checked="" type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Cochez l'une des 4 cases suivantes <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date _____		
3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLÉES		
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE FRANÇAISE <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique Nom ou dénomination sociale CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) Prénoms _____ Forme juridique Etablissement Public N° SIREN _____ Code APE-NAF _____ Domicile ou siège Rue 3, rue Michel-Ange Code postal et ville 17 517 914 PARIS CEDEX 16 Pays FRANCE Nationalité Française N° de téléphone (facultatif) _____ N° de télécopie (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____		
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

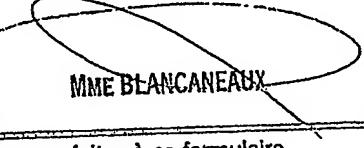
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	18 OCT 2002	
LEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0213022	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		PEAUCELLE	
Nom		Chantal	
Prénom		Cabinet ARMENGAUD AINE	
Cabinet ou Société			
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-1189	
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)		01-45-53-05-50	
N° de télécopie (facultatif)		01-45-53-80-21	
Adresse électronique (facultatif)		armengau@club-internet.fr	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques	
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe			
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mandataire : Chantal PEAUCELLE 	
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  Mme BLANQUEAUX	

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BREVET
SUITE

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES
DATE 18 OCT 2002

LIEU 75 INPI PARIS

0213022

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 G/W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP/AC 60.806-1653
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE VICTOR SEGALEN
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	146, rue Léo-Saignat
	Code postal et ville	[330176] BORDEAUX
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DE POITIERS
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	Hôtel Pinet 15 rue de l'Hôtel Dieu
	Code postal et ville	[86034] POITIERS CEDEX
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mandataire : Chantal PEAUCELLE <i>Chantal</i>
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI <i>Blancaneaux</i> Mme BLANCANEUX

Criblage de molécules à activité anti-prion :
kits, méthodes et molécules ciblées.

La présente invention se rapporte à du criblage de molécules à activité anti-prion. Elle vise plus particulièrement des kits de criblage de molécules à activité anti-prion, les méthodes de criblage, et une famille de molécules à activité anti-prion mise en évidence à l'aide du crible selon l'invention.

Les prions sont des protéines infectieuses responsables chez les mammifères de certaines maladies neuro-dégénératives de type encéphalopathies spongiformes comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme ou encore les maladies dites « de la vache folle » chez les bovins ou « tremblante du mouton » chez les ovins. Ces différentes maladies sont provoquées par des agents infectieux non conventionnels : à la différence des agents infectieux traditionnels (bactéries, virus par exemple), ils ne contiennent pas d'acides nucléiques. Le Professeur Stanley Prusiner a formulé l'hypothèse de « la protéine seule », selon laquelle l'agent infectieux ne serait constitué que d'une protéine. Cette protéine existe naturellement dans les cellules sous une forme « normale » (ou PrP^C), c'est-à-dire soluble, essentiellement sous forme d'hélice α et non agrégée donc fonctionnelle. Dans certaines conditions encore inconnues, cette protéine peut se transformer en une forme prion (ou PrP^{sc}). Sous cette forme prion, la protéine forme des agrégats insolubles, essentiellement sous forme de feuillets β . Le caractère infectieux de cette conformation prion PrP^{sc} viendrait du fait que, outre les caractéristiques indiquées précédemment, la protéine sous forme prion gagne également la capacité à catalyser le passage de la forme cellulaire normale PrP^C vers la forme prion PrP^{sc} dans un mécanisme de type « boule de neige ».

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* contient plusieurs protéines se comportant comme des prions (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dès les années soixante, deux mécanismes génétiques non conventionnels y sont décrits. En 1994, les phénotypes correspondants [*PSI*+] et [*URE3*] ont été proposés comme résultant de l'inactivation auto-catalytique des protéines Sup35p et Ure2p respectivement. Ces protéines prions présentent donc a priori une analogie mécanistique avec les systèmes mammifères délétères pour la santé publique. A l'instar de la protéine PrP, la protéine Sup35p « normale » passe d'un état soluble à un état insoluble et agrégé dès que la protéine est en contact avec une autre protéine Sup35p sous la forme prion. Cet état agrégé est vérifié tant par des expériences de centrifugation que par des expériences de localisation intracellulaire. Les prions de la levure peuvent être éliminés (« curés ») par une forte dose (3 à 5 mM) de chlorure de guanidium. Suite à un tel traitement (qui doit être appliqué sur au moins six à dix générations), les agrégats protéiques générés par la présence des prions disparaissent et la protéine en question (Sup35p, par exemple) se retrouve sous une forme normale, soluble, fonctionnelle mais ayant conservé la susceptibilité d'être convertie sous une forme prion si elle se retrouvait à nouveau en contact avec une autre protéine Sup35p dans un tel état.

La protéine Sup35p, en complexe hétérodimérique avec la protéine Sup45p, forme un facteur de terminaison de la traduction. Ce facteur reconnaît les codons stop opales (UGA). Sous sa forme cellulaire normale (soluble et active) dans les souches [*psi*-], Sup35p, en association avec Sup45p termine efficacement la traduction au niveau de ces codons opales. Dans une souche [*PSI*+] où la protéine Sup35p est sous forme prion, elle est majoritairement présente sous forme d'agrégats

insolubles. Ne pouvant pas se lier à Sup45p, elle est ainsi non fonctionnelle dans la terminaison de la traduction. Une petite fraction de l'ensemble des protéines Sup35p cellulaire reste toutefois soluble dans ces cellules [PSI^+] où elle 5 permet, en complexe avec Sup45p, d'assurer un « service minimum » de terminaison de la traduction, service essentiel à la survie de la levure. Un système colorimétrique permettant de détecter, de façon indirecte, la forme sous laquelle la protéine Sup35p est présente : normale ou prion, a été élaboré 10 à partir de ces constatations. Ce système, décrit depuis longtemps (voir l'article de synthèse par Fernandez-Bellot et Cullin, 2001), est basé sur l'utilisation de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine : la SAICAR synthétase. Cette enzyme catalyse la 15 formation de 4- (N-succinocarboxamide) -5-aminoimidazole ribonucléotide (SAICAR) à partir de 4-carboxy-5-aminoimidazole ribonucléotide (CAIR). L'allèle *ade1-14* contient un codon opale dans le cadre de lecture du gène *ADE1*. Dans une souche [psi^-], Sup35p en association avec Sup45p va donc arrêter la 20 traduction du gène *ADE1* au niveau de ce codon stop. La protéine *ade1-14p* ainsi traduite sera tronquée et donc non fonctionnelle. En conséquence les substrats en amont de l'enzyme Adelp vont s'accumuler, notamment la 5-aminoimidazole ribonucléotide (AIR). L'AIR étant oxydé en un composé de 25 couleur rouge, les colonies formées par les cellules [psi^-] seront de couleur rouge. En outre, ces cellules seront auxotrophes pour l'adénine. A l'inverse, dans une souche [PSI^+], la protéine Sup35p est essentiellement présente sous forme d'agrégats donc incapable de s'associer avec Sup45p pour 30 stopper la traduction au niveau du codon opale de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*. En conséquence, les ribosomes vont faire une pause au niveau de ce codon stop avant de reprendre leur activité de traduction (translecture). Une certaine quantité de protéine Adelp fonctionnelle sera donc synthétisée, les

cellules seront autotrophes pour l'adénine et formeront des colonies de couleur blanche à rosée.

Dans un article paru dans P.N.A.S, l'équipe du Pr. Stanley Prusiner divulgue un test de détection de molécules à activité anti-prion (Korth et al., 2001). Ce test est effectué sur un modèle de mammifères (neuroblastomes murins infectés par PrP^{sc}). Les conditions de sécurité (laboratoire P3) et de cultures cellulaires (manipulations assez lourdes) ne 10 permettent pas de réaliser du criblage à haut débit.

La demande WO 98/30909 décrit également un procédé de criblage de molécules à activité anti-prion réalisé sur des rongeurs infectés par un agent transmissible non conventionnel. Cette 15 méthode de criblage présente les mêmes limites que la méthode décrite dans P.N.A.S.

Les travaux des inventeurs les ont amenés à réaliser un système de criblage haut débit pour mettre en évidence des 20 molécules possédant une activité anti-prion, basé sur le système rapporteur colorimétrique de la protéine Sup35p, décrit ci-dessus.

La présente invention est donc relative à un kit de criblage 25 de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.

Bien que basé sur les prions des levures, le kit selon 30 l'invention permet d'isoler des molécules actives contre les prions de mammifères. L'exemple 7 suivant montre que les molécules les plus actives isolées par le Pr. Prusiner présentent également une activité dans le crible selon l'invention.

Pourtant, on observe de nombreuses différences entre les prions de levure et les prions de mammifères. Dans un article de la revue « Cellular and Molecular Life Sciences », le Professeur C.Cullin propose même au vu de ces différences de distinguer les prions de levures de ceux des mammifères en employant le terme de « propagons ». Comme différences notables entre les « prions » (mammifères) et les « propagons » (levure), on peut citer le caractère cytoplasmique des propagons alors que le prion PrP des mammifères est une protéine ancrée à la membrane plasmique, le caractère pathologique des prions de mammifères, ainsi qu'un certain nombre de différences biophysiques (structure tertiaire et quaternaire, réversibilité du curage...)

15

L'un des principaux avantages d'un tel crible réside dans sa parfaite innocuité ce qui permet de le réaliser dans un laboratoire de biologie moléculaire classique de niveau L2, et non, comme requis dans les techniques antérieures, dans un laboratoire de niveau P3.

De plus, la grande facilité d'utilisation et le très faible coût de ce kit rend le criblage à haut débit réalisable.

— L'utilisation de l'antibiogramme permet en outre de tester en une seule expérience un gradient de concentration, contrairement aux tests classiques, dans lesquels seule une concentration est testée. Pour chaque molécule dont on teste l'activité anti-prion, l'utilisation de l'antibiogramme permet également d'avoir des informations sur la toxicité du produit ainsi que sur le rapport activité/concentration, et de déterminer ainsi la meilleure concentration efficace.

Selon un mode de réalisation préféré, la souche [PSI+] utilisée dans le kit selon l'invention porte une inactivation du gène *ERG6*.

5 En effet, les levures sont naturellement assez peu perméables. En particulier, la levure préférée pour la mise en œuvre de l'invention, *Saccharomyces cerevisiae*, présente une imperméabilité telle que la réalisation d'un criblage s'avère particulièrement peu efficace sans cette inactivation.

10 La méthode d'analyse du crible selon l'invention est visuelle. Selon l'activité anti-prion de la molécule testée, les colonies de cellules auront une coloration rouge, rosée ou blanche. Le choix de la souche de levure peut permettre 15 d'améliorer le contraste entre les colonies. En effet, certaines souches dites « Strong » facilitent l'analyse visuelle du crible. De telles souches possèdent un fort niveau 20 d'agrégation des formes prions. A contrario, la souche sera dite « Weak ». Les souches préférées pour la mise en œuvre de l'invention sont donc les souches de type « Strong ».

D'autres levures peuvent également être utilisées. On citera à titre d'exemples : *Kluyveromyces lactis*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Schizosaccharomyces pombe*.

25 Etant donné la létalité synthétique observée entre l'inactivation du gène *ERG6* et l'inactivation du gène *TRP1*, le gène *ERG6* pourra être délétré en utilisant le gène *TRP1* comme 30 marqueur de délétion.

Avantageusement, le kit comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.

Par curage, on entend une élimination des formes prions dans les cellules de levure. Cette élimination peut être temporaire ou définitive.

5 A titre d'exemple, un agent de curage pour le prion peut être l'eau oxygénée ou préférentiellement, le chlorure de guanidium.

10 Par doses sub-efficaces, on entend des doses qui utilisées seules ne suffiraient pas à curer les prions des levures. Les 15 valeurs de telles doses sont données, dans les exemples qui suivent, pour le chlorure de guanidium.

Les intérêts de la présence d'un agent de curage à des doses 15 sub-efficaces sont de renforcer la sensibilité du cible et d'obtenir un meilleur contraste.

20 Le kit selon l'invention peut être mis en œuvre dans une méthode de criblage de molécules à activité anti-prion. Cette méthode de criblage, également visée par l'invention, est caractérisée en ce qu'elle met en œuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :

- 25 a. réalisation d'un tapis de cellules *in vitro*
- b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
- c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
- d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.

30 Cette méthode possède des avantages analogues à ceux du kit selon l'invention. Il s'agit d'un test visuel, très facile à analyser. Sa mise en œuvre est très simple et peu onéreuse. Les précautions relatives à la sécurité sont celles d'un laboratoire classique de biologie moléculaire. Elle permet le

criblage massif : une personne seule peut cribler manuellement plus de 400 produits par jour. Un criblage de très haut débit serait possible par automatisation de la méthode. Le résultat du crible est révélé au bout de 7 jours, sans qu'il soit nécessaire de recourir à des manipulations lourdes entre le jour J et le jour J+7 (éventuellement un changement de température de l'incubateur). Enfin, cette méthode est particulièrement économique.

10 Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de criblage selon l'invention est caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé. Une des levures préférées pour la mise en œuvre de cette méthode est *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Avantageusement, l'étape a. de la méthode de criblage comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

La méthode peut également comporter les étapes suivantes :

20 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C,
et/ou,
f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

25 L'incubation à 2-6°C permet d'accentuer le contraste des colorations des colonies.

Préférentiellement, le test de criblage secondaire pourra comporter les étapes suivantes :

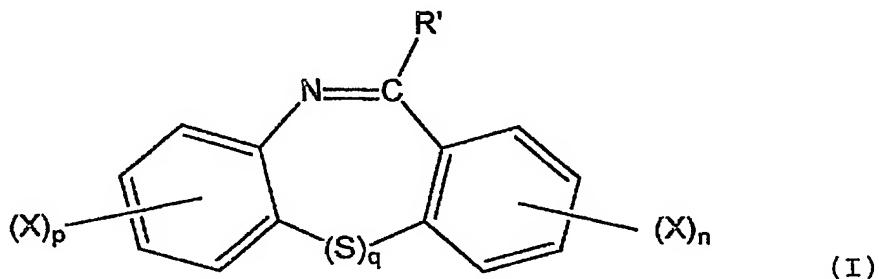
30 - construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- réalisation des étapes a. à e. de la méthode de criblage selon l'invention, l'étape a. comportant en

outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

Un tel crible secondaire permet de tester très rapidement si 5 les molécules isolées lors du crible primaire peuvent avoir un effet général sur les prions chez la levure. En effet, les gènes *SUP35* (responsable du prion [*PSI*+]) et *URE2* (responsable du prion [*URE3*]) codent pour des enzymes ayant des fonctions totalement différentes et dont les séquences primaires sont 10 très éloignées.

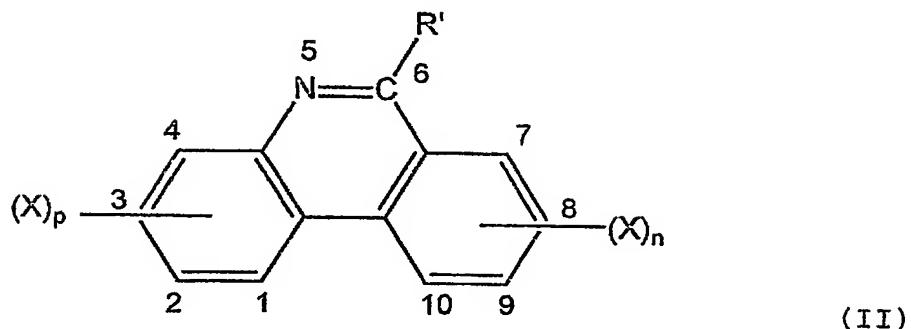
L'invention couvre également les molécules isolées par la méthode de criblage selon l'invention.

15 En particulier, la méthode de criblage a permis d'isoler des agents anti-prion ayant la formule (I) suivante :



20 dans laquelle R^1 est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,
 X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SR^3 , OR^3 , OH , NO_2 , COR^3 , $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones, de préférence CH_3 .
25 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,
 q égale 0 ou 1.

Elle vise plus particulièrement les agents anti-prion de formule (II) :



5

dans laquelle R¹ représente un groupement H, NH₂, NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, NH-CH(CH₃)-(CH₂)₃-N(CH₂-CH₃)₂,

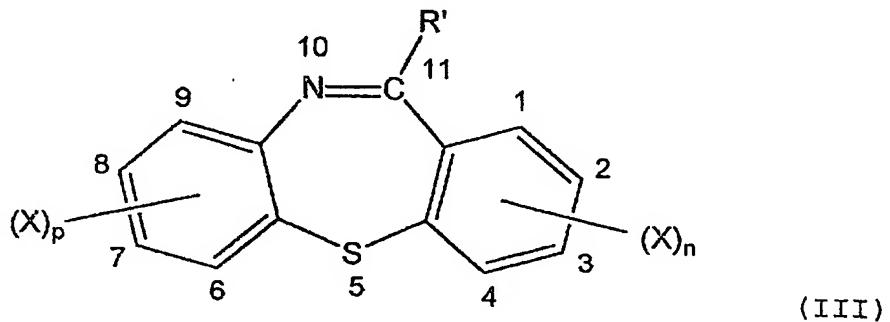
X représente F, Cl,

10 p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

Certains composés de cette famille sont particulièrement actifs. Il s'agit de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine, ainsi que de leurs dérivés chlorés, en

15 particulier lorsque le chlore est placé en position 8, 9, 10, de préférence, en position 10 (voir dans les exemples qui suivent).

20 L'invention couvre en particulier les agents anti-prion de formule (III) :



dans laquelle R¹ représente un groupement H, NH₂, NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, NH-CH(CH₃)-(CH₂)₃-N(CH₂-CH₃)₂,

x représente F, Cl,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou

5 2.

Cette famille de molécules, appelée « Kastellpaolitines » par les inventeurs, possède à un degré plus ou moins fort l'activité anti-prion recherchée. En particulier, les dérivés 10 chlorés de cette famille sont particulièrement efficaces. Les meilleures efficacités sont obtenues lorsque le chlore est placé en position 2, 3, 4, de préférence, en position 4 (voir KP1 dans les exemples qui suivent).

15 Les agents anti-prion selon l'invention sont particulièrement utiles pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir et/ou à traiter les maladies neurodégénératives, en particulier de type à agrégation de protéines, telle que les encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de 20 Hungtinton... Ces médicaments peuvent être à visée humaine ou vétérinaire, en particulier pour des animaux domestiques (vaches, moutons, ...) ou sauvages (lynx, cervidés tels que biches, élans, ...)

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples ci-dessous et en se référant aux figures suivantes:

- la figure 1 se rapporte à la faisabilité du crible,
- la figure 2 illustre le protocole de criblage,
- 30 - la figure 3 est relative à l'isolement des Kastellpaolitines, de la phénanthridine et à leur relation structure/activité,
- la figure 4 se rapporte à la détermination de l'activité de la 6-aminophénanthridine,

- la figure 5 présente les résultats des tests de cure liquide,
- la figure 6 se rapporte au crible secondaire basé sur le prion [URE3], et,
- 5 - la figure 7 démontre la validation du test avec la chlorpromazine et la quinacrine.

Exemple 1 : Réalisation du crible.

10 1. Matériel et méthodes

Organismes (*Saccharomyces cerevisiae*) et milieux de culture

La souche de levure haploïde [*PSI*+] 74-D694 (Mat a, *ade1-14*,

15 *trp1-289*, *hiss3-Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*) a été utilisée dans

la mise au point de la méthode de criblage. La souche utilisée est dite « *Strong* » car elle présente un phénotype bien marqué lorsque le facteur de terminaison de la traduction Sup35p est sous une forme prion ou agrégée.

20 Afin d'augmenter la pénétration des inhibiteurs, les inventeurs ont modifié génétiquement cette souche en y introduisant une mutation du gène *ERG6*. Ce gène intervient dans la biosynthèse de l'ergostérol, composant de la paroi cellulaire des levures. La mutation a été réalisée par 25 insertion au niveau du site chromosomique du gène *ERG6* d'une « cassette de délétion » correspondant au gène marqueur *TRP1* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *ERG6*. Cette cassette a été produite par PCR en utilisant le plasmide pFA6a-kanMX6 comme 30 matrice et les oligonucléotides oBM1060 (5') et oBM1061 (3') comme amorces. Les cellules de levure 74-D694 « *Strong* » ayant intégré la cassette de délétion (souche appelée STRg6, déposée à la CNCM le 10 octobre 2002 sous le numéro I-2943) sont celles qui se développent sur milieux minimum dépourvu en

tryptophane. La mutation *Δerg6::TRP1* a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche **STRg6** comme matrice et les oligonucléotides oBM1030 (5') et oBM1063 (3') comme amorces.

5

Les amorces PCR utilisées présentent les séquences en nucléotides suivantes :

oBM1060 5' CGATTTAAGTTTACATAATTAAAAAAACAAGAATAAAATAATATAG
TAGGCAGCATAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3' (SEQ ID N°1)

10 oBM1061 5' CTGCATATATAAGGAAAATAGGTATATCGTGCCTTATTGAATCTTAT
TGATCTAGTGAATGAATTGGCTCGTTAAC 3' (SEQ ID N°2)

oBM1030 5' GGTACCTCGTTCCCGTAC 3' (SEQ ID N°3)

oBM1063 5' CAGTCAGAAATCGAGTTCCA 3' (SEQ ID N°4)

15 Sauf indication du contraire, les souches de levure sont cultivées à 30°C dans du milieu riche (YPDψ) ou dans du milieu minimum. Lorsque ce n'est pas explicitement spécifié, les pourcentages correspondent à un rapport masse/volume. La forme gélosée est obtenue par ajout d'agar à 2%.

20 YPDψ : 1% d'extrait de levure (FISHER®), 2% de peptone (Gibco®) et 2% de glucose ;

Milieu minimum : 0,175% de yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (Difco®), 0,75% de sulfate d'ammonium et 2% de glucose. Ce milieu est amené à pH 6. Afin de

25 compenser les éventuelles auxotrophies, ce milieu peut être complété, après stérilisation, par ajout d'acides aminés (0,002% de L-Histidine et/ou 0,004% de L-Leucine et/ou 0,003% de L-Tryptophane) ou de bases azotées (0,0025% d'Uracile et/ou 0,008% d'Adénine).

30

Méthode de criblage de substances à activité anti-prionique (« Prion Halo Assay »)

La méthode de criblage élaborée est basée sur le principe de l'antibiogramme. En effet, les composés à tester sont déposés

sur un disque en papier filtre stérile, lui-même déposé sur une boîte de milieu YPD ψ solide contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium préalablement ensemencée avec environ 10^6 cellules de la souche *STRg6* afin de réaliser un tapis de levure.

5 L'ajout d'une faible quantité de chlorure de guanidium (0,2 mM), dose sub-efficace pour curer les prions chez la levure (la dose efficace étant de l'ordre de 3 à 5 mM) permet d'augmenter la sensibilité du test (voir la partie Résultats). Les boîtes carrées de 12 cm de côté sont ensuite incubées 3

10 jours à 23,5°C pour permettre l'apparition et la croissance des colonies de levures. Ces boîtes sont ensuite stockées 3 jours à 4°C afin d'accentuer le coloration rouge présente autour des disques imbibés de substances actives sur la forme prion de la protéine Sup35p. La comparaison avec les témoins 15 négatifs (dépôt du solvant des inhibiteurs testés) et positif (dépôt d'une solution de chlorure de guanidium à 300 mM, provoquant une élimination efficace des protéines Sup35p sous une forme prion) permet de juger de l'efficacité d'un composé. La figure 2 illustre le protocole de la méthode de criblage :

20 (1) Culture de la souche *STRg6* ; (2) Dépôt et étallement avec des billes de verre stériles de 3 & 4 mm de diamètre, d'environ 10^6 cellules en phase exponentielle de croissance sur une boîte de milieu solide YPD ψ contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium—constitution du "tapis" de cellules ; (3)

25 Dépôt des disques de papier filtre stériles selon un quadrillage permettant l'analyse de 32 composés (témoins inclus) et dépôt de 20 μ l maximum de chacun des produits à tester ; (4) Incubation ; (5) Numérisation du résultat obtenu ; (6) Exemple présentant l'isolement d'un composé 30 présentant une forte activité anti-prion.

Synthèse de 11-aminodibenzo[b,f] [1,4] thiazépines et de la 6-aminophénanthridine

Les 11-aminodibenzo[b,f] [1,4]thiazépines, appelés encore Kastellpaolitines, peuvent être préparés en une seule étape. 5 La synthèse de ces produits a déjà été décrite dans la publication de Mettey et al., 1997.

2. Résultats

10 **Principe et faisabilité du crible**
 Le chlorure de guanidium, le seul produit connu pour curer efficacement les prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a servi non seulement de témoin positif tout au long du criblage, mais aussi pour étudier la faisabilité de la méthode ainsi que pour la mettre au point. Le chlorure de guanidium cure efficacement les différents prions de levure à une dose comprise entre 3 et 5 mM (Fernandez-Bellot et Cullin, 15 2001). Dans ces conditions, la cure nécessite une présence constante de ce produit pendant six à dix générations en phase exponentielle de croissance compromettant la faisabilité du crible sur boîte tel que les inventeurs souhaitaient le réaliser.

25 La figure 1 montre la faisabilité du crible.
 Les trois panneaux de gauche : une souche [PSI+] est cultivée pendant 48H en présence de chlorure de guanidium à 5 mM (avec 0,2% DMSO final) ou, comme contrôle avec seulement 0,2% DMSO final. A T = 0, puis toutes les 24H, une goutte de 10 µL 30 (environ 10^4 cellules) est déposée sur une boîte de milieu riche. La cure au chlorure de guanidium commence à avoir un effet après 24H de traitement, soit après 6 générations environ (une coloration rosée commence à apparaître). Au bout de 48H, soit après 12 générations environ, la goutte de

cellules présente une coloration nettement rouge, signe d'une cure complète des cellules [PSI+].

Le panneau du milieu : quelques cellules sont prélevées à T = 48H et sont striées sur un milieu frais. Elles forment presque 5 toutes des colonies rouges dans le cas de la cure au chlorure de guanidium.

Le panneau de droite : ces même cellules sont culottées au fond d'un tube Eppendorf après culture liquide. Dans le cas de la cure au chlorure de guanidium, elles forment un culot 10 rouge.

La première étape a donc consisté à déterminer si le chlorure de guanidium pouvait avoir un effet visualisable sur boîte sur des cellules [PSI+] avec le système de pastilles à 15 antibiogramme. Une fois cette étape réalisée, les inventeurs ont mis au point les conditions optimales de température, de milieu, de densité ainsi que de type cellulaire à utiliser (figure 2). La souche présentant la meilleure sensibilité est la souche STRg6 cultivée à 23,5 °C et en présence de 200 µM de 20 chlorure de guanidium. En effet, l'introduction d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium dans le milieu permet d'augmenter la sensibilité du test.

----- Criblage d'une chimiothèque -----

25 Des composés (environ 1000) ont été passés au crible en utilisant les conditions optimisées par les inventeurs (figure 2). Sur chaque boîte, 15 µl de DMSO sont déposés sur le filtre en haut à gauche (témoin négatif) et 15 µl d'une solution de chlorure de guanidium en solution à 300 mM dans le DMSO 30 (témoin positif) sont déposés sur le filtre en bas à droite. Le même volume (15 µl) de chacun des produits de la banque (tous en solution à 10 mM dans le DMSO) est déposé sur les filtres restants (trente par grande boîte de Pétri carrée). Un signal positif (visualisation d'un halo rouge autour du disque

de papier filtre stérile sur lequel le produit est déposé) a été obtenu pour cinq produits. Ces produits correspondent à quatre molécules d'une même famille, appelées « Kastellpaolitines » par les inventeurs, et à une cinquième 5 bien connue : la phénanthridine.

Exemple 2 : Identification des Kastellpaolitines et de la phénanthridine.

10 Les structures chimiques des Kastellpaolitines et de la phénanthridine sont présentées dans la figure 3B. Le panneau 3A montre une analyse comparative de la taille des halos rouges obtenus respectivement avec l'ensemble de ces molécules 15 (toutes déposées en quantité équivalentes : 15 μ l d'une solution à 10 mM dans le DMSO). Cette expérience permet de comparer l'activité relative de chacun de ces produits. Le plus actif est la Kastellpaolitine 1 (ou KP1) suivi par la phénanthridine.

20

Synthèse et test de la 6-aminophénanthridine

Une analyse comparative de la phénanthridine d'une part, et des Kastellpaolitines d'autre part montre plusieurs points 25 communs entre ces deux groupes de molécules (figure 3). Les différentes molécules y sont classées de la moins active à la plus active et leurs formules respectives indiquées. Toutes sont tri-cycliques, le cycle central contenant dans tous les cas un azote en double liaison avec un carbone adjacent. Par 30 contre, chez toutes les Kastellpaolitines, le carbone du cycle central qui est en double liaison avec cette azote porte un groupement amino, ce qui n'est pas le cas pour la phénanthridine. Cette observation a conduit les inventeurs à vouloir tester la 6-aminophénanthridine.

La 6-aminophénanthridine peut être préparé selon le mode opératoire mis au point par Kessar et al, 1969.

La 6-aminophénanthridine a donc été passée au crible selon l'invention, en comparaison avec les Kastellpaolitines 1 (KP1) 5 et 5 (KP5) ainsi qu'avec la phénanthridine. Le résultat est très net : la 6-aminophénanthridine est encore plus active que les Kastellpaolitines et que la phénanthridine.

La figure 4 illustre les résultats de cette comparaison : 10 l'activité de la 6-aminophénanthridine a été déterminée sur boîte et comparée à celle des KP1 et 5 et de la phénanthridine. Pour les quatre molécules, la même quantité est déposée (10 μ l d'une solution à 10 mM). Dans le cas du témoin positif (chlorure de guanidium), la solution utilisée 15 était à 300 mM.

Par conséquent, en greffant ce groupement amino, caractéristique des Kastellpaolitines sur la phénanthridine, on a augmenté fortement l'activité de cette dernière.

20

Exemple 3 : Synergie entre les produits isolés à l'aide du crible et le chlorure de guanidium

25 Toutes les molécules actives ont été isolées dans un milieu contenant une faible dose de chlorure de guanidium (200 μ M / dose efficace = 4 mM). Ce parti pris établi lors de la mise au point du crible répondait au souci d'augmenter la sensibilité (et donc le seuil de détection de la méthode). L'effet des 30 molécules dans des milieux contenant plus (500 μ M) de chlorure de guanidium ou n'en contenant pas, a par la suite été observé. La phénanthridine est toujours active sur un milieu sans chlorure de guanidium, mais son activité augmente fortement en fonction de la quantité de chlorure de guanidium

(pourtant en dose nettement sub-efficace) dans le milieu. Ce résultat indique une synergie d'action entre le chlorure de guanidium et la phénanthridine. Le même résultat a été obtenu pour toutes les autres molécules isolées par les inventeurs 5 (les Kastellpaolitines et la 6-aminophénanthridine).

Exemple 4 : Vérification de la cure en milieu liquide

10 Les inventeurs ont ensuite voulu déterminer si les halos rouges observés dans le test levure correspondaient bien à de la cure du prion [PSI+] et non pas à un artéfact (par exemple ces halos rouges pourraient être dus à une inhibition directe 15 de la chaîne de biosynthèse de l'adénine par ces molécules, ce qui conduirait à une accumulation de l'AIR). Si ces molécules 20 curent efficacement le prion [PSI+], un traitement en culture liquide de cellules [PSI+] suivi d'un lavage desdites cellules doit leur permettre de former des colonies rouges sur un milieu gélosé ne contenant plus les molécules. Ces tests ont été réalisés avec la 6-aminophénanthridine sur la souche 25 « strong » sauvage 74-D694.

Les conditions de cure en milieu liquide--sont les suivantes : 25 une souche [PSI+] est cultivée pendant 5 jours en milieu liquide en présence des quantités indiquées des différents produits (voir figure 5). Toutes les 24H, une fraction aliquote est lavée en milieu vierge de tout produit et déposée sur un milieu gélosé solide (lui aussi vierge de tout produit) 30 qui est traité ensuite comme indiqué en figure 2.

Comme montré dans la figure 5, la 6-aminophénanthridine est capable de curer partiellement le prion [PSI+] dans un nombre significatif de cellules. L'efficacité de cure peut être

notablement augmentée en rajoutant une dose sub-efficace (100 μ M) de chlorure de guanidium dans le milieu de culture. Dans une telle cure liquide, le même effet synergique que celui observé dans le test sur boîte est également retrouvé.

5

Exemple 5 : Mise au point et utilisation d'un crible colorimétrique secondaire basé sur l'utilisation de [URE3], un autre prion de levure

10

Un autre test rapide sur boîte a été réalisé, basé sur un autre prion de levure : [URE3]. Ce test constitue un crible secondaire qui permet de généraliser l'effet des produits isolés lors du crible primaire à un autre prion de levure. De 15 la sorte, il est possible d'écartier les molécules actives uniquement contre le prion [PSI+] et donc moins intéressantes car d'un effet non général.

20 Pour le prion [URE3] la souche haploïde utilisée est CC34 (Mat α , *trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3*).

La souche NT34 qui a servi pour le crible secondaire a été construite à partir de CC34, souche dans laquelle la phase codante-du-gène *DAL5* a été remplacée par celle du gène *ADE2* en 25 utilisant la même méthode que celle utilisée pour la construction de la souche STRg6. Pour cela une cassette de délétion correspondant au gène *ADE2* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *DAL5* a été produite par PCR en utilisant de l'ADN 30 génomique de la souche haploïde BY4742 (Mat α , *his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0*) comme matrice et les oligonucléotides : ACAACAAAACAAGGATAATCAAATAGTGTAAAAAAAAAAATTCAAGATGGATTCTAGAACAG TTGG (SEQ ID N°5) (5'), et,

TATATTCTTCTCTGATAACAATAATGTCAGTGTATCTCACCACTATTATTACTTGTCTA

GATAAGC (SEQ ID N°6) (3') comme amorces.

La mutation *dal5::ADE2* a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche NT34 comme matrice et

5 les oligonucléotides :

ATAGTCTCTGCTCATAG (SEQ ID N°7) (5'), et,

GCTTACAGAAATTCTAC (SEQ ID N°8) (3') comme amorces.

La souche NT34 (*Mat a, trpl-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3, dal5::ADE2*) a été déposée à la CNCM le 10 octobre

10 2002 sous le numéro I-2942.

Ce crible est basé sur le même système colorimétrique que le crible primaire. Dans la souche de levure NT34, le gène *ADE2* n'est plus sous contrôle de son propre promoteur, mais sous 15 celui du gène *DAL5*. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme prion ([URE3]), la transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est activée donc le gène *ADE2* est exprimé, donc les souches sont blanches et autotrophes pour l'adénine. Lorsque 20 la protéine Ure2p est sous forme normale ([ure3-0]), la transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est réprimée donc le gène *ADE2* n'est pas exprimé, donc les souches sont rouges et auxotrophes pour l'adénine. Lorsque la souche NT34 25 est traitée avec 5mM de chlorure de guanidium pendant une dizaine de générations, elle forme des colonies rouges—(comme attendu et comme le ferait la souche [PSI+] utilisée pour le 30 criblage primaire). Comme on peut l'observer sur la figure 6, la phénanthridine et la 6-aminophénanthridine provoquent l'apparition d'un halo rouge lorsqu'elles sont déposées sur le petit filtre lui-même déposé sur le tapis de cellules préalablement étalées sur le milieu nutritif gélosé (même procédé que pour le crible primaire, voir figure 2). Ce résultat suggère que ces produits sont également actifs sur le prion [URE3]. Il est à noter, toutefois, que ce crible secondaire est nettement moins sensible que le crible

primaire. Il est donc très utile pour observer rapidement si l'effet des molécules isolées lors du premier crible est généralisable à d'autres prions de levure mais en aucun cas il ne saurait se substituer au crible primaire.

5

Exemple 6 : Vérification de la cure de [URE3] en milieu liquide

Deux types d'expériences ont été menés afin de vérifier que l'effet observé sur boîte avec la souche NT34 correspond bien 10 à de la cure. Tout d'abord, des cellules dans les zones environnant les filtres ont été récupérées pour le témoin négatif (DMSO), positif (chlorure de guanidium) pour la phénanthridine et pour la 6-aminophénanthridine. Ces cellules 15 ont ensuite été striées sur un milieu frais exempt de toutes ces molécules. Les cellules récupérées autour des filtres forment toutes des colonies rouges, à l'exception de celles récoltées autour du témoin négatif. Ce résultat montre que la coloration rouge observée sur boîte pour la souche NT34 correspond bien à une cure et non à un artefact lié à une 20 inhibition d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine (dans ce cas, la coloration rouge serait perdue sur un milieu sans inhibiteur). L'effet de cure de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine a également été vérifié directement 25 sur le prion—[URE3]... Des cellules [URE3] de la souche CC34 poussent sur un milieu appelé USA alors que des cellules curées ([ure3-0]) sont incapables de pousser sur ce milieu. Les inventeurs ont examiné la capacité de cellules [URE3] traitées par 200 μ M de chlorure de guanidium (témoin négatif), 30 par 5 mM de chlorure de guanidium (témoin positif) ou par différentes doses de 6-aminophénanthridine (seule ou en combinaison avec 200 μ M de chlorure de guanidium) à pousser sur un milieu USA. La 6-aminophénanthridine est capable de curer le prion [URE3] de façon significative et, tout comme pour le prion [PSI+], cet effet est accentué par une faible dose de

chlorure de guanidium (200 μ M). Ces résultats, outre le fait qu'ils valident le crible secondaire avec la souche NT34, suggèrent que l'effet des inhibiteurs mis en évidence par ledit crible devrait être général sur tous les prions de levure.

Exemple 7 : Validation du crible avec deux molécules actives sur le prion des mammifères PrP : la chlorpromazine et la quinacrine

Le laboratoire de Stanley Prusiner, père de l'hypothèse « protéine seule » et prix Nobel en 1997, a isolé un certain nombre de molécules actives sur le prion de mammifère PrP grâce à un système de cellules murines (neuroblastomes) chroniquement infectées par le prion PrP^{sc} (Korth et al., 2001). Ce système, de par sa lourdeur et sa complexité, ne permet pas un criblage massif comme celui mis au point par les inventeurs. Aussi l'approche du groupe de Stanley Prusiner a-t-elle été de tester une à une, parmi les molécules déjà utilisées comme médicaments, toutes celles qui passent la barrière hémato-encéphalique. Certaines molécules, comme notamment la quinacrine (utilisée comme anti-paludéen depuis longtemps) ou la chlorpromazine (un anti-dépresseur) présentent une activité notable dans leur système. De façon à valider le crible, les inventeurs ont donc testé la chlorpromazine et la quinacrine dans leur système levure. Comme montré dans la figure 7, ces deux molécules présentent une certaine activité contre le prion [PSI⁺]. Il faut toutefois noter que leurs activités sont nettement inférieures à celle de la 6-aminophénanthridine. On peut également relever que la chlorpromazine et la quinacrine, tout comme l'ensemble des molécules mis en évidence par l'invention, présentent une forte synergie d'action avec le chlorure de guanidium (Sur la figure 7, le milieu utilisé contient 200 μ M de chlorure de guanidium). Ce dernier résultat suggère que ces deux molécules

agissent sur la même voie biochimique que les molécules isolées selon l'invention.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la quinacrine, dont l'activité est environ dix fois supérieure à celle de la 5 chlorpromazine dans le test du Pr. Prusiner, présente également une activité nettement supérieure à celle-ci dans le crible mis au point par les inventeurs. En outre, tout comme dans le test du Pr. Prusiner, la chlorpromazine et la quinacrine nécessitent un traitement prolongé (au moins 6 jours dans le 10 cas du test du Pr. Prusiner, au moins deux à trois jours dans le cas du crible selon l'invention) avant de déceler une activité.

Toutes ces corrélations entre l'activité de la quinacrine et de la chlorpromazine selon le test ou le crible utilisé, 15 permettent de valider l'utilisation de la méthode selon l'invention pour réaliser des criblages haut débit en vue d'isoler des molécules susceptibles de constituer des médicaments efficaces (sur les mammifères et en particulier sur l'homme) contre des maladies neurodégénératives impliquant, 20 des agrégats protéiques, de type encéphalopathies spongiformes, maladies d'Alzheimer, de Hungtinton...

Références bibliographiques

5 Fernandez-Bellot et al., "The protein-only theory and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the prions and the propagons", CMLS, 2001, 58:1857-1878.

10 Korth C. et al., "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease", PNAS, 2001, 98(17):9836-9841.

15 Mettey Y. et al., "Synthesis of 11-Aminodibenzo[b,f][1,4]thiazepines and Fluoro derivatives", J. Heterocyclic Chem., 1997, 34:465-467.

Kessar S.V. et al., Tetrahedron Letters, 1969, 1151.

Revendications

1. Kit de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.
2. Kit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène *ERG6* de la souche [PSI+] est inactivé.
3. Kit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.
5. Kit selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de curage des prions est le chlorure de guanidium.
6. Méthode de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :
 - a. réalisation d'un tapis de cellules in vitro
 - b. dépôt des--composés à tester selon la méthode--de l'antibiogramme,
 - c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
 - d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.
7. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé.
8. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'étape a. comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

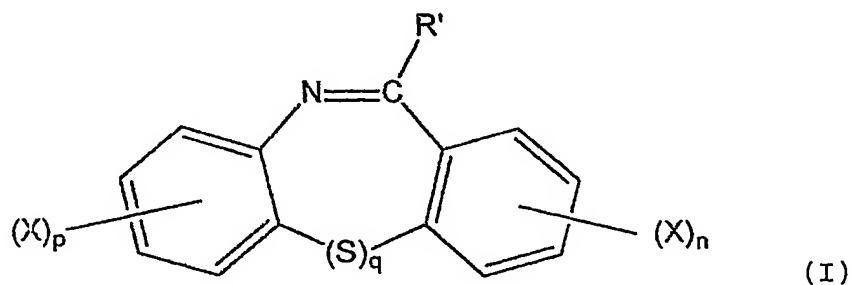
10. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre les étapes suivantes :

10 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C,
et/ou,
f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

11. Méthode de criblage selon la revendication 10,
15 caractérisée en ce que le test de criblage secondaire comporte les étapes suivantes :

- construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- 20 - réalisation des étapes a. à e. des méthodes selon les revendications 6 et 10, l'étape a. comportant en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

25 12. Agents anti-prion de formule (I)

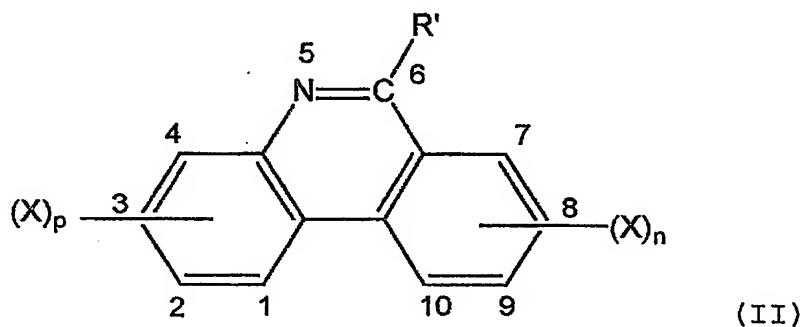


dans laquelle R^1 est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

5 X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH , NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones, p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

10 q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :



R^1 représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$ $N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl ,

20 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

14. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :

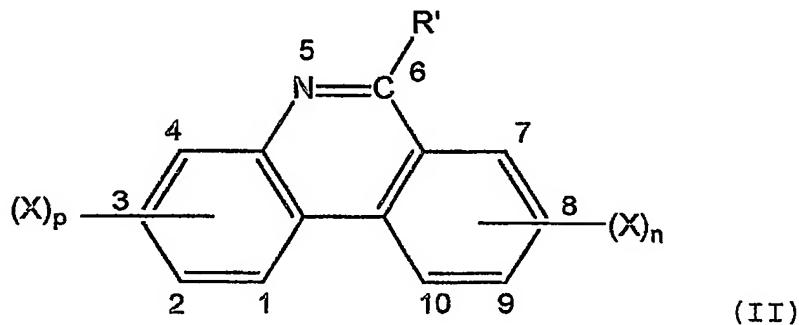
dans laquelle R' est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

5 X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH , NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

10 q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :

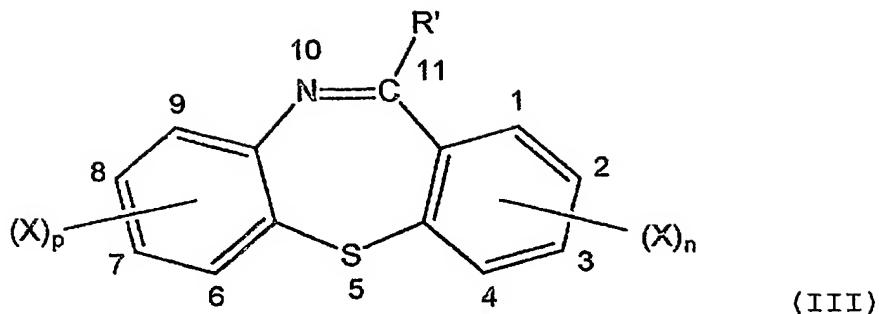


15 R' représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$, $N(CH_3)_2$, $NH-CH-(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl ,

20 p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

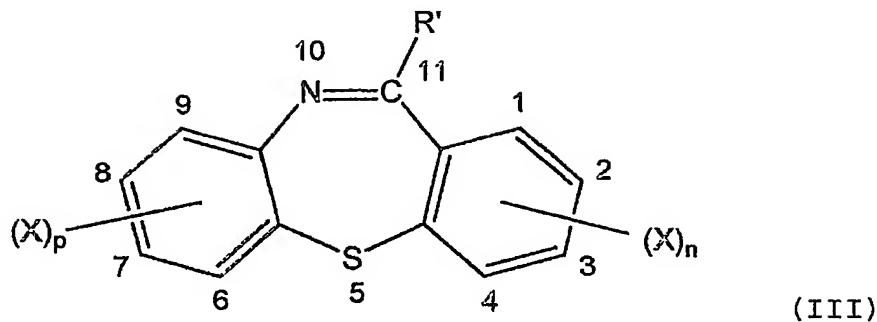
14. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :



R^1 représente un groupement H, NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$
 $N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,
5 X représente F, Cl,
 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou
2.

15. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque
10 des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament
destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant
des agrégats protéiques.

15. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce
que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les
maladies d'Alzheimer et de Hungtinton.



R' représente un groupement H, NH₂, NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, NH-CH(CH₃)-(CH₂)₃-N(CH₂-CH₃)₂,

5 X représente F, Cl,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

15. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque
 10 des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament
 destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant
 des agrégats protéiques.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce
 15 que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les
 maladies d'Alzheimer et de Huntington.

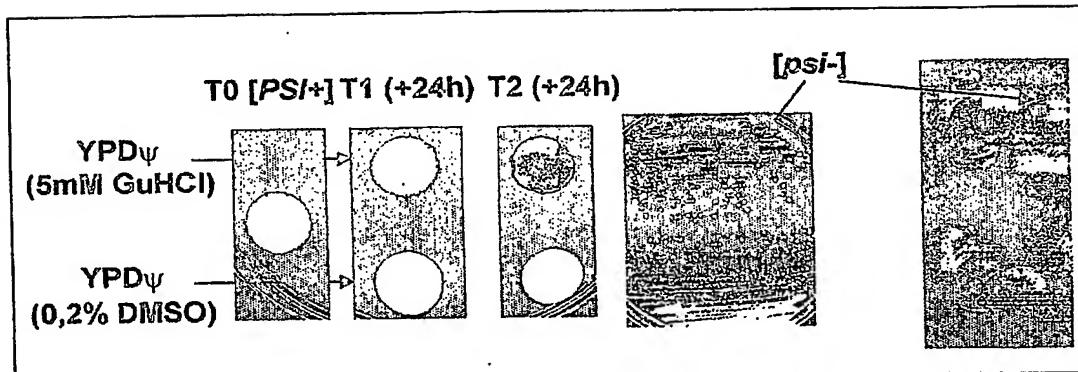


Figure 1

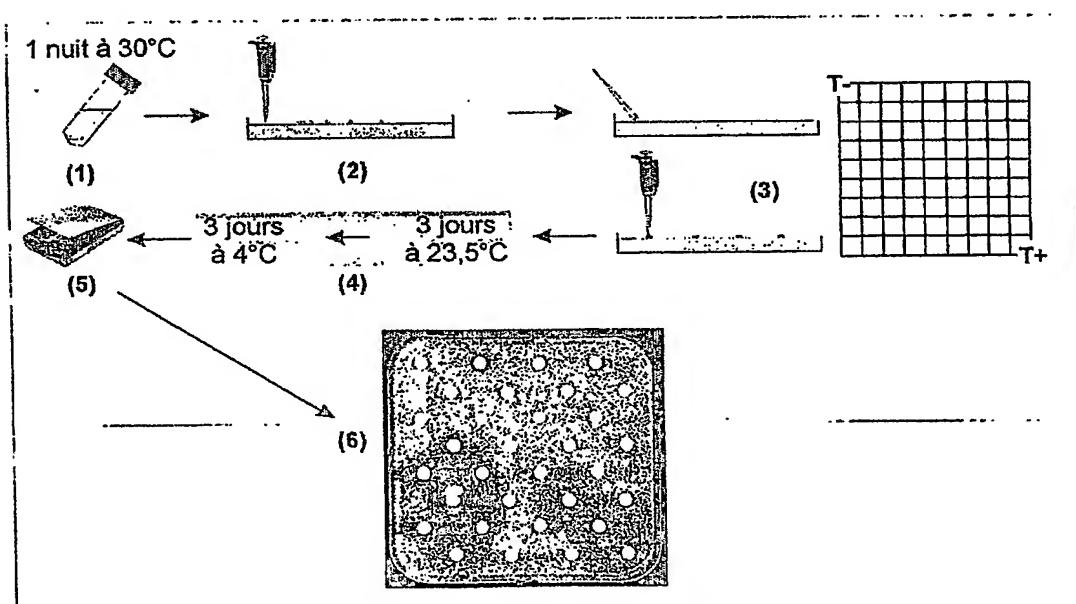


Figure 2

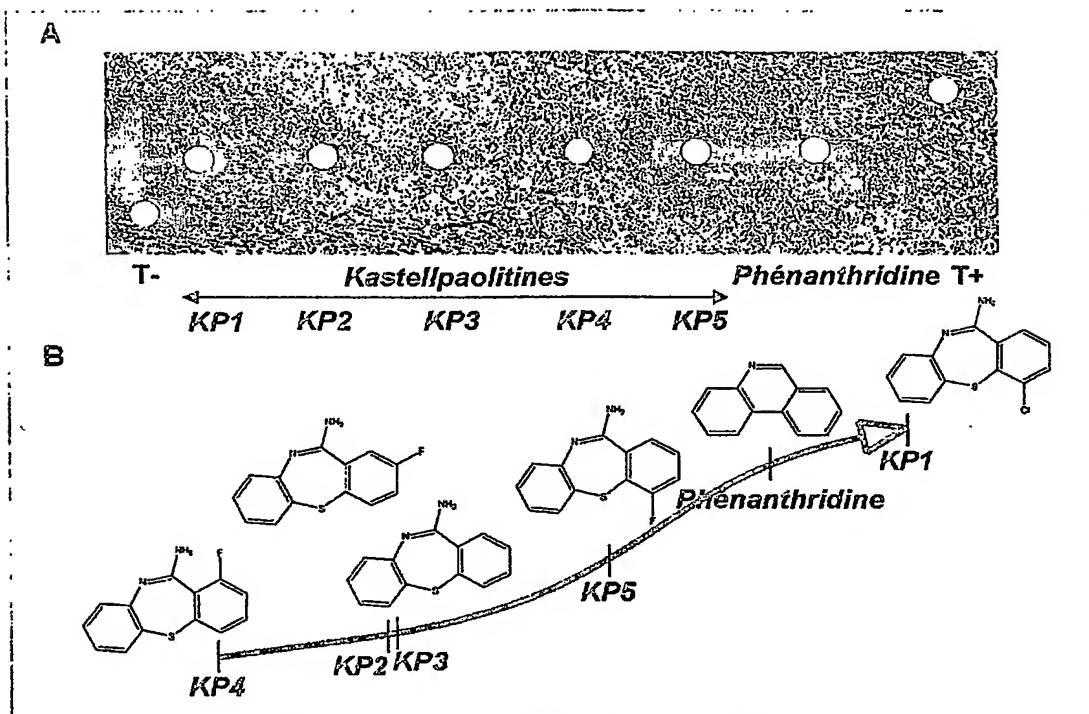


Figure 3

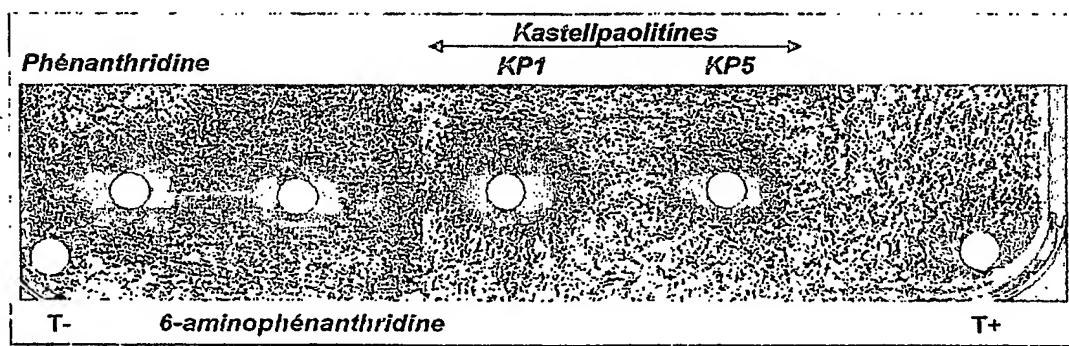


Figure 4

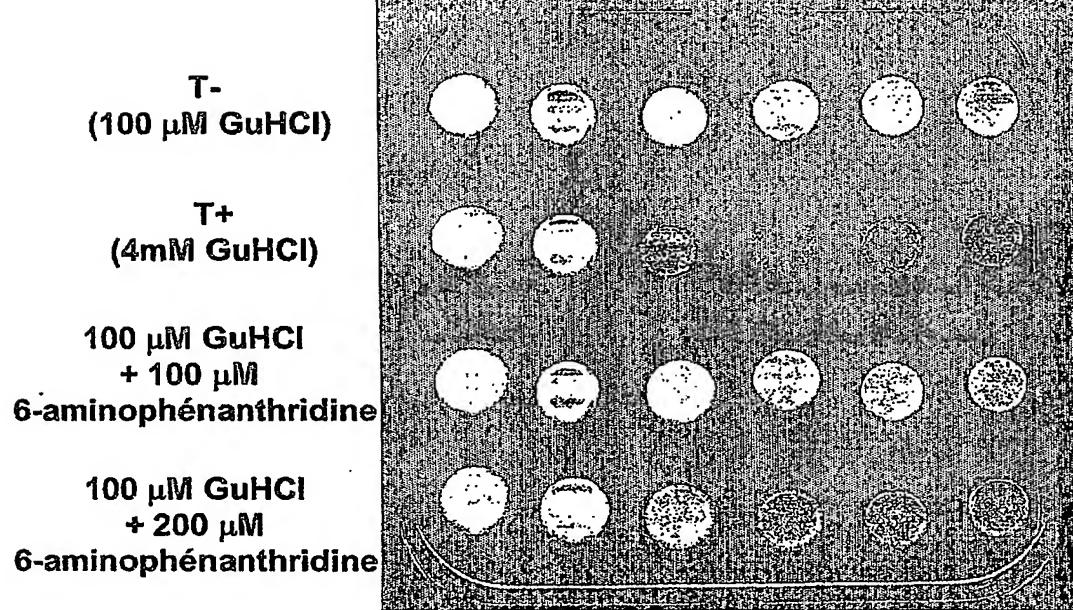


Figure 5

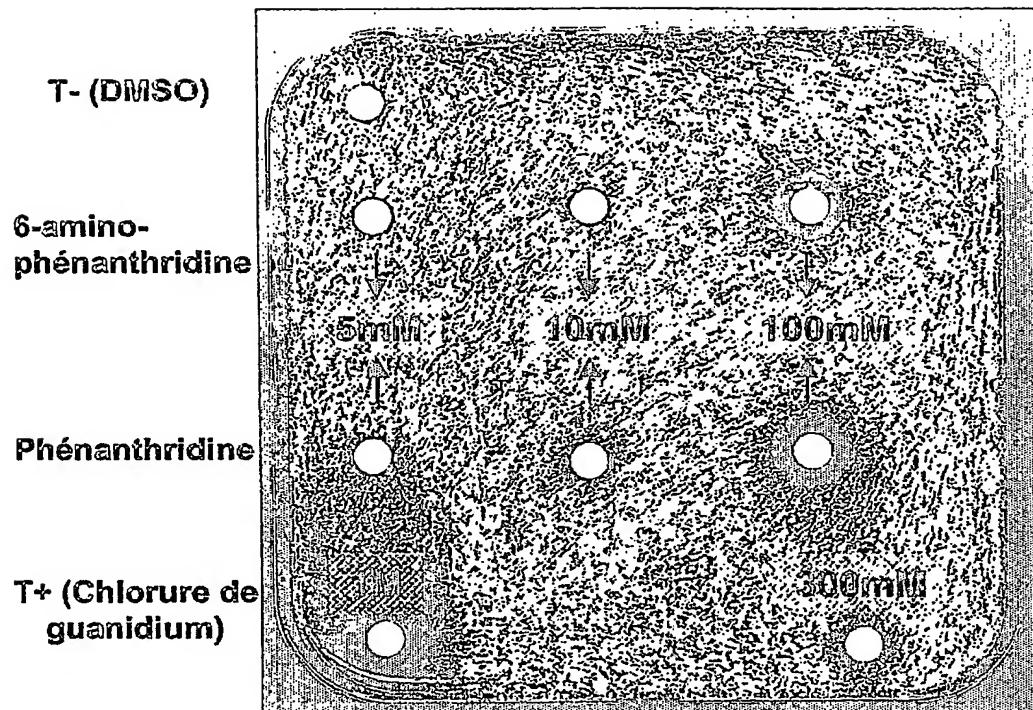


Figure 6

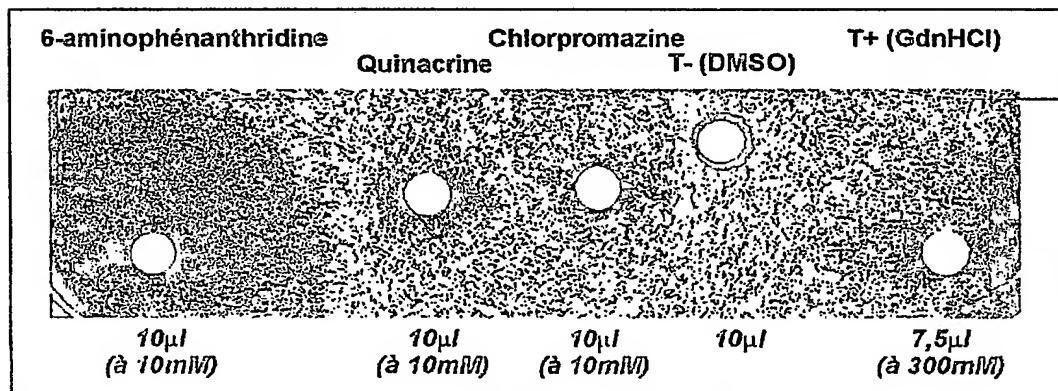


Figure 7

1

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

<120> Criblage de molécules à activité anti-prion : kits, méthodes et molécules ciblées.

<130> CNRS-1653

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1
cgatttaagt tttacataat ttaaaaaaac aagaataaaa taataatata gtaggcagca 60

taagcggatc cccgggttaa tttaa 84

<210> 2

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2
ctgcataatat agaaaaatag gtatataatcg tgcgctttat ttgaatctta ttgatctagt 60

gaatgaattc gagctcgttt aaac 84

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3
ggtacacctcg tccccgtac 18

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 4 20
cagtcagaaa tcgagttcca

<210> 5
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 5 60
acaacaaaac aaggataatc aaatagtgt aaaaaaaaaa ttcaagatgg attctagaac
66
agttgg

<210> 6
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 6 60
tatattcttc tctgataaca ataatgtcag tgtatctcac cactattatt acttgtttc
69
tagataagc

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 7 17
atagtctctg ctcataag

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8

gcttacagaa attctac

17

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...
INV

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP/AC 60.806-1653
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 13 022
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN & UNIVERSITE DE POITIERS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		BLONDEL
Prénoms		Marc
Adresse	Rue	54, rue de la Rive
	Code postal et ville	12 912 510 SAINT POL DE LEON
Société d'appartenance (facultatif)		C.N.R.S.
2 Nom		BACH
Prénoms		Stéphane
Adresse	Rue	3 cité de Kermenguy
	Code postal et ville	12 912 510 SAINT POL DE LEON
Société d'appartenance (facultatif)		C.N.R.S.
3 Nom		CULLIN
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	11 Impasse Vivaldi
	Code postal et ville	13 317 00 MERIGNAC
Société d'appartenance (facultatif)		Université Victor Segalen
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 Le 18 octobre 2002 Mandataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

INV

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP/AC 60.806-1653
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 13 022
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLÉES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN & UNIVERSITE DE POITIERS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		TALAREK
Prénoms		Nicolas
Adresse	Rue	135 rue Jean Jaurès Apt 23 Res La Malvoisie
	Code postal et ville	13 314 010 TALENCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		VIERFOND
Prénoms		Jean-Michel
Adresse	Rue	2, rue Molière
	Code postal et ville	94170 MAISONS ALFORT
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
<input checked="" type="checkbox"/> Nom		METTEY
Prénoms		Yvette
Adresse	Rue	5, rue de l'ancienne Comédie
	Code postal et ville	18160 POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
Le 18 octobre 2002		
Mandataire : Chantal PEAUCELLE		
n° 92-1189		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.